



Tsibul'nikov, S. Y., Mukhomedzyanov, A. V., Maslov, L. N., Ovchinnikov, M. V., Sidorova, M. V., Kudryavtseva, E. V., Bushov, Y. V., Lishmanov, Y. B., & Khaliulin, I. (2018). Synthesis and Infarction-Limiting Properties of Peptide Agonists of Opioid Receptors. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 52(4), 291-293.  
<https://doi.org/10.1007/s11094-018-1808-3>

Peer reviewed version

Link to published version (if available):  
[10.1007/s11094-018-1808-3](https://doi.org/10.1007/s11094-018-1808-3)

[Link to publication record in Explore Bristol Research](#)  
PDF-document

This is the author accepted manuscript (AAM). The final published version (version of record) is available online via Springer at <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11094-018-1808-3> . Please refer to any applicable terms of use of the publisher.

## University of Bristol - Explore Bristol Research

### General rights

This document is made available in accordance with publisher policies. Please cite only the published version using the reference above. Full terms of use are available:  
<http://www.bristol.ac.uk/red/research-policy/pure/user-guides/ebr-terms/>

ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ПЕПТИДНЫХ АГОНИСТОВ ОПИОИДНЫХ  
РЕЦЕПТОРОВ ПРИ РЕПЕРФУЗИИ СЕРДЦА

А.В. Мухомедзянов\*, Л.Н. Маслов\*, М.В. Овчинников\*\*, М.В. Сидорова\*\*,

Е.В. Кудрявцева\*\*, Ю.В. Бушов\*\*\*, Ю.Б. Лишманов\*, И. Халиулин<sup>+</sup>\*НИИ кардиологии Томский НИМЦ РАН, Томск, РФ; \*\*ЗАО «Синтез пептидов», Москва,  
РФ; \*\*\*Томский государственный университет, Томск, РФ; <sup>+</sup>Университет Бристоля,

Великобритания

Адрес для корреспонденции: E-mail: maslov@cardio-tomsk.ru Л.Н. Маслов

У крыс, наркотизированных  $\alpha$ -хлоралозой, воспроизводили коронароокклюзию (45 мин) и реперфузию (2 ч). Опиоидные пептиды даларгин (0,1 мг/кг), глудалан (0,1 мг/кг), дельтолей (0,03, 0,1 и 0,2 мг/кг) вводили за 5 мин до реперфузии. Было установлено, что глудалан (0,1 мг/кг) и дельтолей (0,1 мг/кг) уменьшают соотношение размер инфаркта/область риска (РИ/ОР). Даларгин не влиял на размер инфаркта. Инфаркт-лимитирующий эффект дельтолея исчезал при уменьшении (0,03 мг/кг) или увеличении (0,2 мг/кг) дозы пептида. Антагонисты опиоидных рецепторов (ОР) налтрексон (5 мг/кг) или налоксона метиодид (5 мг/кг) устраняли инфаркт-лимитирующий эффект глудалана. Следует отметить, что налоксона метиодид не проникает через гематоэнцефалический барьер. Полагают, что инфаркт-лимитирующий эффект глудалана при реперфузии связан с активацией периферических ОР. Кардиопротекторный эффект дельтолея является дозозависимым.

**Ключевые слова:** сердце, реперфузия, опиоиды, посткондиционирование

В России госпитальная летальность у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) и подъемом сегмента ST старше 70 лет достигает 17%, а у больных моложе 70 лет – 4% [1]. В США внутригоспитальная летальность при ОИМ, по данным J.J. Goldberg и соавт. [6] составляет 4,7%. Смертность при ОИМ во многом зависит от величины размера инфаркта. Так, согласно данным израильских кардиологов [4], у пациентов, у которых пик тропонина I (маркер некроза кардиомиоцитов) в плазме крови превышает 50 мкг/л, госпитальная смертность составляет 4%, а у больных с пиком тропонина I менее 50 мкг/л этот показатель составляет 1%. Фракция выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) достоверно больше у больных

с низкой концентрацией тропонина I в крови [4]. Установлено, что чем выше пик креатинфосфокиназы-MB (КФК-MB, маркер некроза) у пациентов с ОИМ, тем меньше ФВ ЛЖ и тем выше вероятность неблагоприятного исхода в течение одного года после инфаркта [5]. В настоящее время единственным эффективным методом лечения ОИМ является реканализация инфаркт-связанной коронарной артерии с помощью тромболитика или коронарной ангиопластики, но даже в случае успешного восстановления коронарного кровообращения пациенты умирают в результате ишемического и реперфузионного повреждений сердца. Поскольку в большинстве случаев острого инфаркта миокарда невозможно предвидеть возникновение коронаротромбоза и предупредить ишемическое повреждение сердца, лекарственная терапия должна быть направлена на профилактику реперфузионного повреждения сердца. Определенный интерес в этом отношении представляют пептидные агонисты опиоидных рецепторов (ОР), поскольку морфин способен оказывать инфаркт-лимитирующий эффект при реперфузии [7].

Цель исследования: оценить инфаркт-лимитирующий эффект пептидных агонистов опиоидных рецепторов при реперфузии сердца.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было выполнено на 96 крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 300 г. Животных наркотизировали внутрибрюшинным введением  $\alpha$ -хлоралозы (60 мг/кг, внутрибрюшинно, Sigma) и подключали к аппарату искусственной вентиляции легких “SAR-830 Series” (CWE Inc. США). Коронароокклюзию (45 мин), реперфузию (2 ч) и оценку соотношения размер инфаркта/область риска осуществляли, как описано нами ранее [2]. Во время ишемии и реперфузии регистрировали систолическое и диастолическое артериальное давление и ЭКГ.

В работе использовали следующие гексапептиды: даларгин (Tyr-*D*-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-OH), глудалан (Tyr-*D*-Ala-Gly-Phe-Leu-Glu-OH), дельтолей (Tyr-*D*-Ala-Phe-Gly-Phe-Leu-NH<sub>2</sub>). Образцы пептидов даларгин и глудалан с чистотой более 98% предоставлены ЗАО «Синтез пептидов». Пептиды использовали в следующих дозах: даларгин – 0,1 мг/кг, глудалан – 0,1 мг/кг, дельтолей – 0.03, 0,1 и 0.2 мг/кг. Пептиды вводили в бедренную вену за 5 мин до реперфузии. При выборе дозы даларгина (0,1 мг/кг) мы исходили из наших данных об антиаритмическом эффекте этого пептида при коронароокклюзии [9], поскольку молекулярная масса других гексапептидов близка к молекулярной массе даларгина, то их также использовали в дозе 0,1 мг/кг. Неселективные антагонисты ОР налтрексон (Sigma) и

налоксона метиодид (Sigma) вводили внутривенно за 10 мин до реперфузии [8]. Налоксона метиодид является стандартным антагонистом ОР, не проникающим через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), поэтому с его помощью можно оценивать роль периферических опиоидных рецепторов. В группу контроля вошли животные, которым внутривенно вводили физиологический раствор.

Твердофазный синтез дельтолея проводили в автоматическом режиме на синтезаторе Tribute-UV компании Protein Technologies, Inc. (США) в соответствии с программой для однократной конденсации Fmoc-аминокислот. В работе использовали производные аминокислот: Fmoc-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-ОН, Fmoc-Phe-ОН, Fmoc-Gly-ОН, Fmoc-D-Ala-ОН, Fmoc-Leu-ОН, а также реагенты и растворители (4-метилпиперидин, 1,8-диазабицикло[5.4.0]-ундец-7-ен (DBU), N-метилморфолин (NMM), трифторуксусную кислоту (TFA), N,N,N,N-тетраметил-О-(бензотриазол-1-ил)урония тетрафторборат (TBTU) компании Fluka (Швейцария). Реакции конденсации проводили при помощи TBTU в диметилформамиде (DMF) с использованием 4-кратных избытков производных аминокислот и NMM в качестве основания. Для деблокирования α-аминогрупп использовали раствор 10% 4-метилпиперидина и 2% DBU в DMF. Синтез проводили с С-конца, исходя из 0.52 г (0.375 ммоль) амидной смолы Rink amide-AMPS-resin компании SENN Chemicals со степенью замещения 0.72 ммоль/г.

По окончании синтеза пептидил-полимер отфильтровывали, промывали DMF (3 × 30 мл), дихлорметаном (5 × 30 мл), сушили на воздухе. Получали 0.81 г пептидилполимера.

Для отщепления пептида от полимера использовали смесь реагентов: 10.0 мл трифторуксусной кислоты + 0.5 мл деионизированной воды + 0.5 мл триизобутилсилана. Время отщепления 1 час. Сырой продукт высаживали диэтиловым эфиром, отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром. Было получено 0.25 г технического продукта с содержанием основного вещества 58% по результатам аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Очистку проводили методом препаративной обращённо-фазной ВЭЖХ на хроматографе фирмы Knauer (ФРГ), используя колонку Kromasil 100-10-C18 (30×250 мм), размер частиц сорбента 10 мкм. В качестве элюентов применяли буфер А – 0.1% TFA, буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А. Элюцию проводили от 90% буфера А градиентом 0.5% в мин буфера Б со скоростью потока 20 мл в мин. Пептид детектировали при длине волны 220 нм. Получили 120 мг готового вещества с содержанием основного продукта 99.35%. Выход 45.3% в расчёте на стартовую аминокислоту.

Пептиды даларгин и глудалан получены классическими методами пептидной химии в растворе, даларгин очищен с помощью ионообменной хроматографии на катионообменнике, а глудалан - кристаллизацией.

Аналитическую ВЭЖХ пептидов проводили на хроматографе компании Gilson (Франция), на колонке Kromasil 100 C18, 5 мкм (4.6 × 250 мм) (Швеция), подвижная фаза: буфер А – 0.05М КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 3.0, буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А, элюция градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 20 до 80% за 30 мин. Детекция - при 220 нм.

Структура полученных пептидов доказана спектрами <sup>1</sup>Н-ЯМР и данными масс-спектрометрии. Спектры <sup>1</sup>Н-ЯМР получены на спектрометре WM-500 компании Bruker (Германия) в DMSO-*d*<sub>6</sub> при 300К. Масс-спектры регистрировали на приборе Ultraflex TOF/TOF компании BrukerDaltonics (Германия) с время пролётной базой методом MALDI.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программы “Statistica6.0”. Для оценки достоверности полученных результатов использовали критерий Манна – Уитни. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ . Результаты всех экспериментов представлены в виде среднего арифметического (М) ± стандартной ошибки среднего (SEM).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нам не удалось обнаружить достоверного изменения ЧСС, систолического и диастолического АД во время коронароокклюзии и реперфузии, хотя имела тенденция к снижению систолического АД. Во время реперфузии после 45-минутной ишемии у некоторых крыс возникали единичные желудочковые экстрасистолы. Частота их возникновения в группах обычно составляла около 10%, что согласуется с нашими ранее опубликованными данными [2]. Кроме того, у крыс не были зафиксированы реперфузионные злокачественные нарушения сердечного ритма (желудочковая тахикардия, желудочковая фибрилляция). По вышеуказанным причинам антиаритмический эффект опиоидов обнаружить не удалось. Следует отметить, что аритмогенный эффект пептиды также не оказывали. Антагонисты ОР не влияли на показатели гемодинамики.

Как показано на рисунке 1, в контрольной группе отношение размера инфаркта к области риска составило 48,2%. После внутривенного введения дельтолея в дозе 0,1 мг/кг мы обнаружили достоверное уменьшение индекса РИ/ОР на 16 % по сравнению с контрольной группой (рис.1). Стоит отметить, что в литературе нет данных о способности

дельтолея оказывать кардиопротекторный эффект, поэтому мы решили проверить, будет ли данный пептид оказывать больший эффект при увеличении или уменьшении дозы. Однако при использовании дельтолея как в дозе 0,03 мг/кг, так и в дозе 0,2 мг/кг нам не удалось получить статистически значимого снижения соотношения РИ/ОР (рис.1).

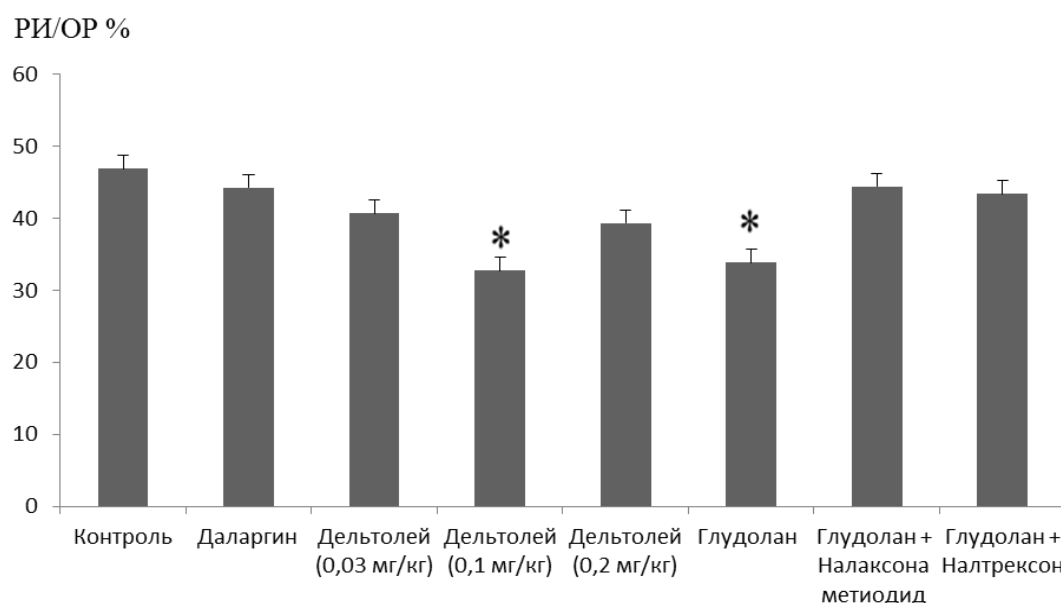


Рис. 1. Размер инфаркта/ область риска при 45-минутной коронароокклюзии и 120-минутной реперфузии у крыс. Введение агонистов за 5 мин до реперфузии. (M ± SEM). \*p<0,05 по сравнению с контролем

Исчезновение инфаркт-лимитирующего эффекта при увеличении дозы дельтолея не является артефактом, поскольку эксперименты с дозой 0,2 мг/кг проводили независимо друг от друга два сотрудника нашей лаборатории и обоим не удалось обнаружить кардиопротекторного эффекта этого пептида в указанной дозе. Сходные данные получили К.А. Aitchison и соавт. [3], которые проводили эксперименты на изолированном перфузируемом сердце с неселективным пептидным агонистом  $\delta$ -OP DADLE. Оказалось, что добавление указанного пептида в перфузионный раствор в конечной концентрации 10 нМ способствует уменьшению соотношения ЗИ/ОР более чем в 2 раза. Однако, если DADLE использовали в конечной концентрации 1 мкМ, то кардиопротекторный эффект существенно ослабевал, а в случае совместного применения налтриндола (селективный антагонист  $\delta$ -OP) и DADLE (1 мкМ) было отмечено достоверное увеличение размера инфаркта [3]. В случае блокады к-ОР нор-биналторфимином инфаркт-лимитирующий эффект DADLE (1 мкМ) усиливался. Эти факты позволили авторам сделать вывод, что

ослабление кардиопротекторного эффекта DADLE при увеличении концентрации связано с активацией  $\kappa$ -ОР [3]. На наш взгляд, исчезновение протекторного действия дельтолея при увеличении дозы связано с активацией неидентифицированных опиоидных или неопиоидных рецепторов.

После внутривенного введения другого гексапептида глудолана в дозе 0,1 мг/кг нам также удалось обнаружить достоверное снижение соотношения РИ/ОР (рис.1). Антагонисты ОР налтрексон и налаксона метиодида (не проникает через ГЭБ), при введении за 5 мин до инъекции глудолана устраняли эффект данного пептида. Следовательно, можно предположить, что кардиопротекторный эффект глудолана связан с активацией периферических опиоидных рецепторов. Сам антагонисты ОР не влияли на соотношение РИ/ОР, данные не представлены на рисунке.

Следует отметить, что и дельтолей и глудолан оказывали эффекты, близкие друг к другу по величине. Это может быть связано с тем, что они имеют схожую аминокислотную последовательность и, возможно, взаимодействуют с одним и тем же субтипом ОР.

Известно, что даларгин в дозе 0,1 мг/кг способен оказывать антиаритмический эффект при коронароокклюзии [9]. Несмотря на то, что даларгин имеет близкую к глудолану и дельтолею структуру, при внутривенном введении нам не удалось обнаружить достоверного изменения индекса РИ/ОР (рис.1). Полученный результат может быть связан с тем, что даларгин, в отличие от вышеупомянутых пептидов, взаимодействует с другими субтипами ОР.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют, что инфаркт-лимитирующий эффект глудолана связан с активацией периферических опиоидных рецепторов. Кардиопротекторный эффект дельтолея зависит от использованной дозы, он фиксируется в дозе 0,1 мг/кг и исчезает при увеличении или уменьшении дозы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда грант 14-15-00008, British Council, British Heart Foundation.

А.В. Мухомедзянов,

Л.Н. Маслов

М.В. Овчинников

М.В. Сидорова

Е.В. Кудрявцева

Ю.В. Бушов

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е.В. Вышлов, В.Ю. Филюшкина, А.Л. Крылов, В.А. Марков, *Сиб. мед. жур. (Томск)*, **29**(1), 25-29 (2014).
2. А.В. Мухомедзянов, Л.Н. Маслов, М.В. Овчинников, и др., *Бюлл. exper. биол. и мед.*, **162**( 9), 284-288 (2016).
3. K.A. Aitchison, G.F. Baxter, M.M. Awan, et al., *Basic Res. Cardiol.*, **95**(1), 1-10 (2000).
4. J. Buber, A. Laish-Farkash, N. Koren-Morag, et al., *Coron. Artery Dis.*, **26**(6), 503-509 (2015).
5. T. Dohi, A. Maehara, S.J. Brener, et al., *Am. J. Cardiol.*, **115**(5), 563-570 (2015).
6. J.J. Goldberger, R.O. Bonow, M. Cuffe, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **66**(13), 1431-1441 (2015).
7. E.R. Gross, A.K. Hsu, G.J. Gross, *Circ. Res.*, **94**(7), 960-966 (2004).
8. L.N. Maslov, Yu.B. Lishmanov, P.R. Oeltgen, et al., *Life Sci.*, **84**(19-20), 657-663 (2009).
9. L.N. Maslov, Yu.B. Lishmanov, *Int. J. Cardiol.*, **40**(2), 89-94 (1993).



# INFARCT LIMITING EFFECT OF THE PEPTIDE AGONISTS OF OPIOID RECEPTORS DURING CARDIAC REPERFUSION

A.V. Mukhomedyanov\*, L.N. Maslov\*, M.V. Ovchinnikov\*\*, M.V. Sidorova\*\*, Yu.V.

Bushov\*\*\*, Yu.B. Lishmanov\*, I. Khaliulin<sup>+</sup>

\*Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia; \*\*Synthesize of Peptides Company, Moscow, Russia; \*\*\*Tomsk State University, Tomsk, Russia; <sup>+</sup>University of Bristol, Bristol, UK

It was reproduced coronary occlusion (45 min) and reperfusion (2 hours) in rats anesthetized  $\alpha$ -chloralose. Opioid peptides dalargin (0.1 mg/kg) gludalan (0.1 mg/kg) deltoley (0.03, 0.1 and 0.2 mg/kg) were administered 5 min before reperfusion. It was found that gludalan (0.1 mg/kg) and deltoley (0.1 mg/kg) reduced the infarct size/area at risk ratio (IS/AAR). Dalargin had no effect on infarct size. Infarct reducing effect deltoley disappeared at reduction (0.03 mg/kg) or increase (0.2 mg/kg) of a dose of the peptide. Antagonists of opioid receptors (OR) naltrexone (5 mg/kg) or naloxone methiodide (5 mg/kg) eliminated the infarct limiting effect gludalana. It should be noted that naloxone methiodide (5 mg/kg) does not penetrate the blood-brain barrier. It is believed that the infarct-limiting effect of gludalana during reperfusion is associated with activation of peripheral ORs. Cardioprotective effect of deltoley is dose-dependent.

**Key words:** heart, reperfusion, opioids, postconditioning